永诺生物
Forevergen

Pluslight ECL Kit

User Manual

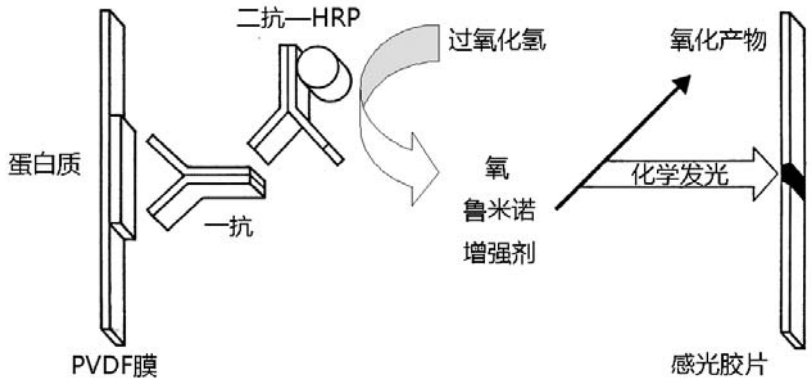
For Western Bloting

增强型化学发光检测试剂盒

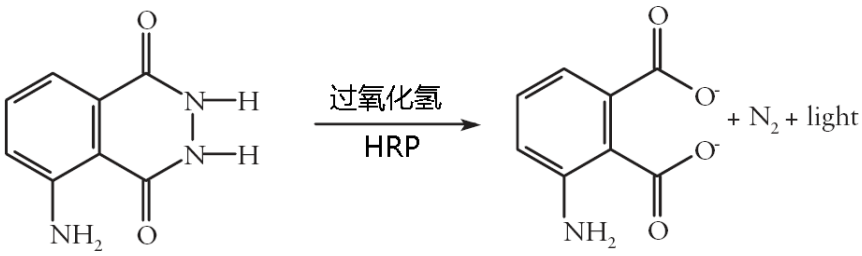
用户手册

2010年12月第一版

一、用途：增强型化学发光检测试剂盒是免疫印迹实验（Western Blotting）中与辣根过氧化物酶（Horse Radish Peroxidase,HRP）配套使用的检测系统。该产品能够高度灵敏、特异地检测固定在膜上的蛋白质。



二、原理： 辣根过氧化物酶催化试剂盒中的过氧化氢释放出氧，使发光底物鲁米诺（Luminol）氧化并发光，在增强剂的作用下，发光强度增加1000倍以上，通过X光胶片曝光即可记录此化学发光的信号。



三、特性：

1. 高灵敏度，与免疫印迹联用可检测1~5pg目的蛋白（图1）。

2. 高特异性，独特的增强剂对非特异发光无放大效应（图2）。

3. 发光时间长，发光底物对酶活性损伤小，发光时间持续达1小时以上（图3）。

4. 稳定性好，配制好的发光液室温放置一个月后仍能有效地检测特异信号（图4）。

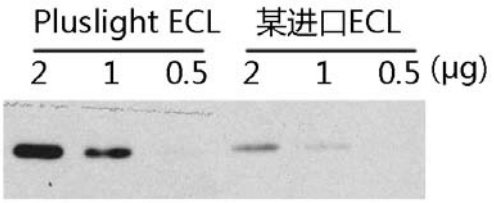


图1：Pluslight ECL 灵敏度高于某进口ECL

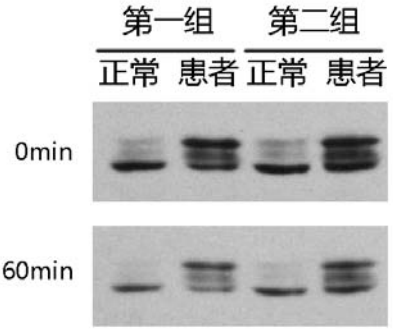


图3：Pluslight ECL 发光时间持久

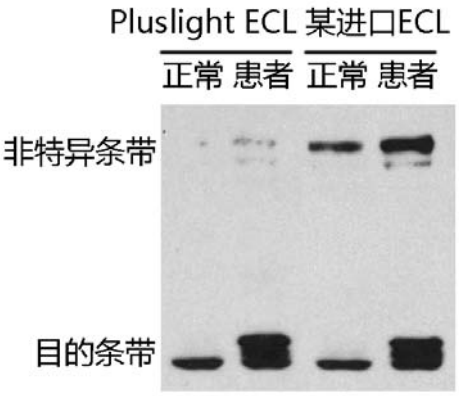


图2：Pluslight ECL特异性优于某进口ECL

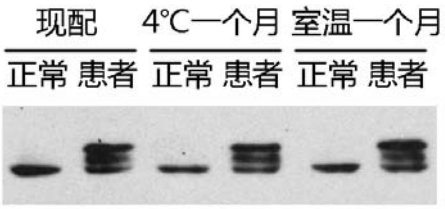


图4：Pluslight ECL具有良好的稳定性

四、使用方法：

1. 将试剂盒中A液与B液以100:1的比例混合（例如：10ml A液+100ul B液）后，避光平衡至室温（约5min），即为ECL工作液。
2. 将膜上的清洗缓冲液吸干后，浸泡至ECL工作液中，孵育2min，保持膜上吸附蛋白的一面朝上。
3. 将膜上的ECL工作液吸干后，置于两层保鲜膜之间，避免形成气泡。
4. 将膜平放在X光片盒中，保持吸附蛋白的一面朝上，于暗室中压上X光片，根据信号的强弱调整曝光时间。

五、使用说明：

1. 使用本试剂盒时，请预先对Western Bloting实验条件进行优化，包括蛋白上样量、

一抗及二抗浓度等，建议您使用永诺生物科技有限公司Plusmind Western Bloting 全套系统，我们的技术支持保证您系统的正常运行。

2. 操作ECL试剂和胶片时请佩带无粉手套。

3. 请配制足够量的ECL工作液，覆盖整张膜，以保证曝光条带的均一性和完整性。

4. 膜与ECL孵育后请尽快检测，以捕获最灵敏的信号。

5. 叠氮钠能抑制辣根过氧化物酶的活性，请勿用作Western Blotting缓冲液的保护剂。

6. 整个Western Blotting操作过程中请保持膜的湿润。

7. 尽管本ECL工作液在室温可稳定一小时以上，仍建议您在使用前再配置ECL工作液；工作液可在2~8℃短期保存，使用前请将工作液平衡至室温。

8. 请勿混合使用不同批次的发光液，或者稀释发光液，以免降低检测的灵敏度和特异性。

六、安全性：

1. 本试剂盒为科研用品，不建议作临床诊断用途。

2. 本试剂盒所含化学物质无特殊毒性，但建议具备一定实验室技术的人员使用。

3. 使用本试剂盒时请穿戴合适的防护性衣物。

4. 如果不慎与眼、皮肤和衣物接触，请立刻用大量清水冲洗。

七、储存：2-8℃密封避光保存一年。

八、常见的问题：

问题：曝光无任何信号

可能的原因及解决方法：

1. 制备样本的细胞或组织中不表达目的蛋白，建议您在UniProt数据库

(http://www.uniprot.org/)查询目的蛋白的组织表达情况；

2. 样本中的目的蛋白被蛋白酶降解，建议您在蛋白裂解液中加入蛋白酶抑制剂，如PMSF；
3. 检查转膜装置是否正常工作，转膜操作是否正确，建议您使用预染marker监测转膜情况；
4. 考马斯亮蓝染色胶和膜，检查转膜情况；
5. ECL工作液已失效，建议您重新配制ECL工作液。

问题：曝光信号太弱

可能的原因及解决方法：

1. 蛋白上样量太少，建议您增加蛋白上样量；
2. 转膜效率太低，建议您监测预染marker的转膜效率；
3. 一抗或二抗浓度太低，建议您增大抗体浓度；
4. 曝光时间太短，建议您延长曝光时间。

问题：曝光信号太强

可能的原因及解决方法：

1. 蛋白上样量太多，建议您减少蛋白上样量；
2. 一抗或二抗浓度太高，建议您优化抗体浓度；

问题：背景较深

可能的原因及解决方法：

1. 操作过程中膜没有保持湿润；
2. 封闭效果不好，建议您新配浓度合适的封闭液，封闭时间要足够长。
3. 一抗或二抗浓度太高，建议您优化抗体浓度；

4. 膜清洗不充分，建议您延长膜清洗时间和次数；

5. 曝光时间太长，建议您优化曝光时间以达到最高的信噪比；

问题：空心条带

可能的原因及解决方法：

1. 出现空心条带的原因一般是目的蛋白的量太大或者抗体浓度太高，导致条带中心ECL底物耗尽所致，此时建议您降低蛋白上样量并进一步稀释抗体。

十、参考文献

1. Burnette, W. N. (1981). ""Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem 112(2): 195-203.
2. Gershoni, J. M. and G. E. Palade (1982). "Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter." Anal Biochem 124(2): 396-405.
3. Blake, M. S., K. H. Johnston, et al. (1984). "A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots." Anal Biochem 136(1): 175-9.

更多详细资料请访问网址：www.forevergen.cn

广州永诺生物科技有限公司

地址：广州市海珠区下渡路下渡商业大厦B栋504室

邮编：510300

电话：020-84456596

E-mail: forevergen@yahoo.cn